

超声水提-离子色谱法测定小麦粉中草甘膦的残留

林秀*

(福建省粮油质量监测所, 福州 350012)

摘要: 目的 建立超声水提-离子色谱法检测小麦粉中草甘膦含量的方法。**方法** 对草甘膦的色谱条件、提取试剂和净化条件进行优化后, 确定样品经超声波纯水浸提后, 采用乙酸溶液、固相萃取柱进行净化, 以 Ion-Pac AS19 阴离子交换分离柱分离, KOH 淋洗液等度洗脱, 抑制型电导检测。**结果** 草甘膦在质量浓度 0.0 ~ 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, 标准曲线的线性回归方程为 $Y=0.053X+0.005$, 相关系数为 0.9996, 检出限为 0.052 mg/kg 。加标回收率在 86.7% ~ 96.5%之间。**结论** 该方法精密度良好, 简便快速, 结果准确可靠, 可为小麦粉中草甘膦的分析测定提供参考。

关键词: 离子色谱法; 小麦粉; 草甘膦

Determination of glyphosate residue in wheat flour by ultrasonic water extraction-ion chromatography

LIN Xiu*

(Institute of Grain and Oil Quality Supervision and Test of Fujian Province, Fuzhou 350012, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of glyphosate in wheat flour by ultrasonic water extraction-ion chromatography. **Methods** After optimizing the chromatographic conditions, extraction reagents and purification conditions of glyphosate, the samples were extracted by ultrasonic pure water, purified by acetic acid solution and solid phase extraction column, separated by Ion-Pac AS19 anion exchange column, eluted by KOH eluent with equal degree, and detected by inhibitory conductivity. **Results** In the range of 0.0–50.0 g/mL glyphosate concentration, the linear regression equation of the standard curve was $Y=0.053X+0.005$, the correlation coefficient was 0.9996, and the detection limit was 0.052 mg/kg . The recovery rate of standard addition is between 86.7% and 96.5%. **Conclusion** This method has good precision, simplicity and rapidity, and the results are accurate and reliable. It can provide reference for the analysis and determination of glyphosate in wheat flour

KEY WORDS: ion chromatography; wheat flour; glyphosate

1 引言

草甘膦(glyphosate, Gly)化学名为 N-(膦羧基甲基)-甘氨酸, 是 1971 年由 Monsanto 公司开发出在世界农业中具有划时代意义的有机磷灭生性的广谱除草剂^[1,2], 但近年来许多研究表明, 草甘膦及其主要降解产物—氨基磷酸(amino methyl phosphonic acid, AMPA)具有与有机磷化合物相似的毒理^[3,4], 会破坏人畜身体健康。为此, 国际食品法典委员会(codex alimentarius commission, CAC)及我国国家标准《食品中农药最大残留限量》均对小麦粉中的草甘膦残留量有着严格的限量规定^[5], 最高残留限量(maximum

residue limit, MRL)值为 0.5 mg/kg 。为此, 建立一种简便、快捷、有效的针对小麦粉中草甘膦残留的检测方法, 将为监测小麦粉品质及食用安全起到至关重要的作用。国内外测定草甘膦常用的分析方法主要有气相色谱法^[6]、高效液相色谱法^[7]、衍生化-气相色谱-质谱联用法^[8]、液相色谱-质谱联用法^[9-12]、薄层色谱法^[13]、分光光度法^[14]。上述部分检测方法仍然存在一定的局限性。如高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、气相色谱(gas chromatography, GC)、气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)技术虽然灵敏度高, 但在分析前需对样品衍生化, 操作过程繁琐、费时,

*通讯作者: 林秀, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 358788964@qq.com

*Corresponding author: LIN Xiu, Engineer, Institute of Grain and Oil Quality Supervision and Test of Fujian Province, Fuzhou 350012, China. E-mail: 358788964@qq.com

且仪器设备较为昂贵。目前,已有利用离子色谱法测定茶叶、转基因大豆等基质中的草甘膦残留^[15,16],但目标物出峰时间较长,且在样品前处理净化过程中需要引入乙腈等有毒有机溶剂,会对环境及实验人员造成一定的危害。因此,研究并建立一种简便快捷、环境友好型的检测小麦粉中草甘膦残留的分析方法具有重要的意义。

本研究针对 Gly 易溶于水,将小麦粉样品采用超声水提后使用乙酸沉淀蛋白,高速离心后的上清液依次过 IC Guard RP 柱、SPE Ag/H 柱进一步纯化后,供离子色谱分析测定,旨在满足相关单位对草甘膦农药残留的检测需求。

2 材料与amp;方法

2.1 仪器与试剂

Dionex ICS-1100 离子色谱仪, 配电导检测器、AS-DV 自动进样器, Chromleon 7.0 色谱控制分析工作站(美国 Thermo Fisher 公司); 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); Allegra 64R 超高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); 涡旋振荡器(德国 Heidolph 公司); Ultra Clear TWF 超纯水机(德国 UV TM 公司); KQ-300 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

CNW IC Guard RP 柱(1.0 cc, 上海安谱科学仪器有限公司); SPE Ag/H 柱(1.0 cc, 天津富集科技有限公司)。

草甘膦标准品(纯度 99.8%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 乙腈(色谱纯)、甲醇、亚铁氰化钾、乙酸锌、乙酸(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司)。

样品: 市售小麦粉样品过 200 目筛, 充分混匀, 置于封口袋内。

2.2 色谱分析条件

色谱柱: Dionex IonPac AS19 阴离子交换柱分析柱(4.0 mm×250 mm); IonPac AG19 保护柱(4.0 mm×50 mm); 流动相: KOH 溶液(由淋洗液在线发生器自动生成), 等度淋洗模式; 抑制器: AERS 500(4 mm)阴离子电解抑制器, 外加抑制模式, 抑制电流为 87 mA; 流速: 1.0 mL/min; 进样体积: 25 μ L; 检测器: 电导检测器, 检测池温度 30 $^{\circ}$ C。

2.3 实验方法

2.3.1 样品前处理

提取: 称取过筛后的小麦粉样品 5 g, 精确至 0.001 g, 于 50 mL 聚丙烯离心管内, 沿管壁缓慢加入 25 mL 超纯水, 摇混使均匀分散, 置往返式振荡器上振摇 3 min, 振荡频率为 180 次/min。再超声提取 30 min, 充分摇匀后在转速为 10000 r/min 的高速冷冻离心机中离心 10 min, 再将离心液用快速滤纸过滤, 收集清晰滤液。移取 10 mL 滤液, 加入 0.3 mL 乙酸溶液(3+97)(V/V), 涡旋振荡 2 min, 再超声 10 min 后加入超纯水定容至 20 mL, 静置 10 min 将样液转移至聚丙烯

离心管内, 10000 r/min 的高速冷冻离心机中离心 10 min。

纯化: 将离心得到的上清液用注射器以 2 mL/min 的流速分别经过活化的 IC Guard RP 柱、SPE Ag/H 柱进一步纯化后, 再过 0.45 μ m 水系滤膜, 供离子色谱分析。

活化: RP 柱依次用注射器将 5 mL 的甲醇, 10 mL 的超纯水过柱; Ag/H 柱用 10 mL 超纯水过柱, 流速均为 2 mL/min, 放置 10 min 使之充分平衡。使用时柱体需垂直, 样液推过柱时应弃去前面 3 mL 流出液后再收集滤液。

2.3.2 标准曲线的绘制

草甘膦标准储备液的配制: 精确称取草甘膦标准品粉末 0.050 g(精确至 0.001 g), 用少量超纯水溶解后转移至 50 mL 塑料容量瓶中, 定容配制成 1000 μ g/mL 标准储备液并于 4 $^{\circ}$ C 左右冰箱保存, 待用。

草甘膦标准工作溶液的配制: 精密量取草甘膦标准储备液适量, 用超纯水稀释配置成质量浓度分别为 0.0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 μ g/mL 的系列标准溶液。按照(1.2)所列色谱条件进行仪器分析, 以所分析标准溶液的高低浓度(μ g/mL)区间为线性范围, 即 0.0~50.0 μ g/mL。该标准系列现用现配。

3 结果与分析

3.1 淋洗液浓度的确定

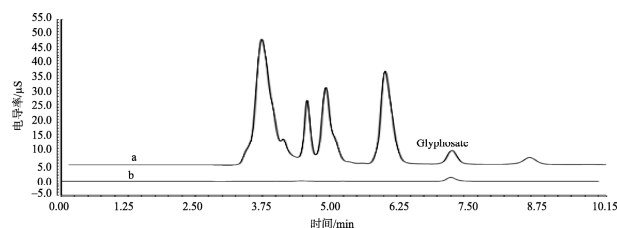
本研究以 2.0 μ g/mL 草甘膦标准溶液作为考察对象, 分别考察 20、25、30、35、40 mmol/L 不同浓度 KOH 等度洗脱对目标峰出峰效果的影响。结果表明, KOH 溶液浓度为 20 mmol/L 时, 色谱分析时间长, 草甘膦出峰时间也晚, 但随着淋洗液浓度的升高出峰时间也逐渐缩短。当淋洗液浓度为 40 mmol/L 时, 虽出峰时间提前但是与基质样品中的杂质峰分离度变差。当淋洗液浓度为 35 mmol/L 时, 出峰时间为 7.260 min, 标准品中的草甘膦离子以及小麦粉样品中的草甘膦离子都能够与其他峰较好的分离, 峰形对称, 出峰时间也较适宜, 并且样品基质对目标峰没有干扰, 也无严重的拖尾现象, 见图 1。综合考虑峰高、峰面积和出峰时间, 本研究最终选择 KOH 浓度为 35 mmol/L。

3.2 提取溶剂的选择

食品中农药残留的提取剂通常采用有机溶剂或者有机溶剂和水的混合溶液。但是草甘膦属于强极性化合物, 不溶于有机物质, 且在超纯水中呈阴离子状态, 有利于使用离子色谱分析检测。基于草甘膦亲水性强的特点, 实验中分别选取了超纯水、乙酸溶液(5+95)(V/V)、NaOH 溶液(5+95)(V/V)3 种提取溶剂, 比较 3 者对加标小麦粉样品的回收率, 表征不同提取溶剂的提取得率。结果表明(图 2), 无论是酸性还是碱性溶液作为提取剂, 草甘膦的回收率均不理想, 且色谱图上杂质峰较多, 严重干扰了目标物的出峰, 对检测结果造成影响。而选用超纯水作为提取剂时, 提取液杂质较少, 目标物峰形良好, 操作简便、成本低廉, 且回收率达到 91.8%。因此本研究选择超纯水作为提取溶剂。

3.3 净化条件的选择

小麦粉中除了含有淀粉、脂肪、无机盐、维生素等外,还含有丰富的蛋白质。其蛋白质含量一般在 11%~20%,比其他谷物产品都高。若不去除提取液中的蛋白质、脂肪等杂质,会对离子色谱上草甘膦的出峰造成严重干扰,并且这些残留物质也会与 KOH 淋洗液发生反应,不仅仪器基线发生较大波动,使色谱柱的分离效果不佳,而且存在的悬浮颗粒物还会对仪器造成损伤,影响检测结果。本文在对小麦粉样品进行预处理时,参考高琳等^[17]的相关研究,分别尝试用 0.3 mL 乙酸溶液(3+97)(V/V)、5 mL 乙腈、2 mL 0.25 mol/L 亚铁氰化钾和 2 mL 1.2 mol/L 乙酸锌溶液 3 种方法对样液中的蛋白质进行沉淀,实验结果见图 3。



注: (a)小麦粉样品(b)草甘膦标准溶液

图 1 离子色谱图

Fig.1 Ion chromatogram

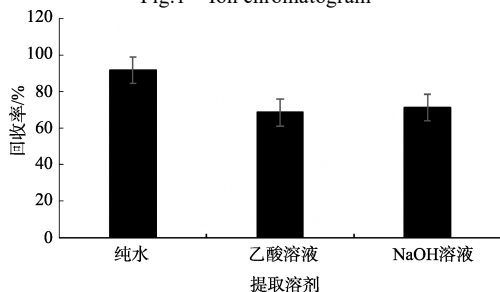


图 2 3 种提取溶剂对小麦粉中草甘膦回收率的影响(n=6)

Fig.2 Effect of 3 kinds of extraction solvent on the recoveries of analytes in wheat flour (n=6)

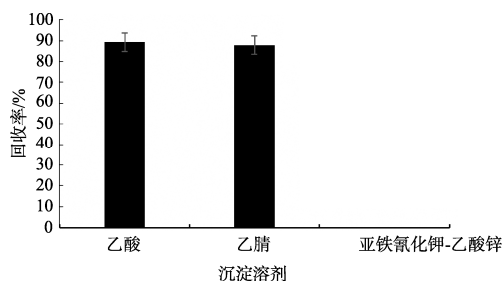


图 3 3 种沉淀剂对小麦粉中草甘膦回收率的影响(n=6)

Fig.3 Effect of 3 kinds of precipitants on the recoveries of analytes in wheat flour (n=6)

结果表明,当使用亚铁氰化钾-乙酸锌作为沉淀剂时,离子色谱上并未检测到加标样品中的目标化合物,这可能是由于沉淀下来的物质对草甘膦有极大的吸附造成的。选用乙酸和乙腈对蛋白质进行沉淀,回收率效果都较好。乙腈虽然具有介电常数较小,易于沉淀蛋白等杂质优点,但

是其本身系一种有毒的有机试剂,对人体有潜在的伤害性,而且加入到样液中的离子含量较高,导致方法检出限偏高。而乙酸作为蛋白沉淀剂,其羧基氢原子能够电离变为氢离子释放出来,从而打破提取液中的电解质平衡,同时乙酸还能通过与提取液中蛋白质争夺结合水,使得蛋白质分子相互聚集沉淀^[18]。在电解质作用、共沉效应和离子效应 3 者的共同作用下,少量的乙酸试剂即可达到较好的净化效果。因此,本研究采用乙酸作为蛋白质沉淀剂。

为了进一步去除提取液中的其他干扰杂质,提高色谱峰分离度,必须对沉淀蛋白等杂质后的提取液进一步纯化。本研究采用固相萃取柱的方法,操作简便,且纯化效果也较为理想。CNW IC Guard RP 柱通过疏水作用能够去除提取液中的糖类、脂类等亲脂型杂质,再使用 SPE Ag/H 柱去除提取液中的氯离子及微量重金属,避免大量的氯离子对草甘膦峰形及对结果定性、定量产生的影响。最后再使用 0.45 μm 水系滤膜进行过滤,以除去提取液中的固体悬浮颗粒,降低离子色谱上机检测分析时对色谱系统的损害。

3.4 线性范围与检出限

按照 2.2 所列色谱条件下,对浓度分别为 0.0, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准系列溶液进行分析。以草甘膦标准溶液的质量浓度为横坐标、色谱峰面积为纵坐标,作回归曲线,以信噪比(S/N)为 3 计算仪器检出限,得到草甘膦线性方程、相关系数及检出。草甘膦溶液标准曲线的的线性回归方程为 $Y=0.053X+0.005$, 相关系数为 0.9996, 在相应的质量浓度范围内(0.0 ~ 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)呈良好线性相关性。另外,其检出限为 0.052 mg/kg,说明仪器具有较高的灵敏度,满足 GB 2763-2019 中对小麦粉草甘膦最大残留量为 0.5 mg/kg 的相关检测要求。

3.5 方法回收率

在以上实验的优化条件下,随机选取市售小麦粉进行加标回收率试验。称取该样品 5 g, 添加 2.5、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等 3 个梯度水平的草甘膦标准溶液,每个添加水平取 6 个平行样,按照 2.3.1 所述方法进行提取和操作,测定结果见表 2。由表 2 可知,方法的回收率在 86.7%~96.5%之间,本方法的回收率较好符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范食品理化检测》^[19]对回收率的要求。

3.6 方法精密度

精密度(重复性)由在回收率实验中所使用的 3 个浓度加标溶液来评估,以各梯度浓度实际测定值的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)来表示,结果见表 1。经过 6 次平行性实验,结果的相对标准偏差在 2.54%~3.59%之间,检测准确,重复性良好,同时本方法的精密度也较好符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范食品理化检测》对精密度的要求。

3.7 实际样品的测定

按所建立的方法对市售随机 3 种小麦粉中草甘膦的实

际残留含量进行测定, 结果见表 2。所测样品中均检出草甘膦, 但含量均未超出国标中对小麦粉草甘膦最大残留量的要求。由此可见, 本方法对小麦粉样品具有极好的适用性, 能够满足实验室间小麦粉中草甘膦残留量检验要求。

表 1 方法的加标回收率与精密度($n=6$)

Table 1 Spike recoveries and precision of five arsenic species ($n=6$)

基体浓度 /($\mu\text{g/mL}$)	加标量 /($\mu\text{g/mL}$)	平均值 /($\mu\text{g/mL}$)	回收率 /%	RSD/ %
	2.5	15.624	86.7	2.54
13.457	5	18.280	96.5	3.59
	10	23.016	95.6	2.78

表 2 实际样品草甘膦含量测定结果

Table 2 Results of determination of glyphosate in actual samples

样品	平均值/(mg/kg)	RSD/%
样品 1	0.279	2.86
样品 2	0.174	3.55
样品 3	0.088	4.77

4 结 论

本文建立了一种简单、快捷测定小麦粉中草甘膦残留量的离子色谱分析方法。样品经超声水提后, 采用乙酸溶液为沉淀剂去除小麦粉中的蛋白质, 过 RP 柱去除样品基质中的疏水性物质, 再过 Ag/H 柱去除提取液中的氯离子及微量重金属后, 经过 $0.45 \mu\text{m}$ 水系针式滤膜过滤后供离子色谱仪分析检测。在小麦粉实际样品的分析测定和试样的加标回收率与精密度实验中进一步证实了该方法的适用性, 适用于小麦粉中草甘膦残留量的快速、准确定性定量分析。

参考文献

- Manas F, Peralta L, Raviolo J, *et al.* Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the comet assay and cytogenetic tests [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2009, 72(3): 834–837.
- Relyea RA. New effects of roundup® on amphibians: predators reduce herbicide mortality herbicides induce antipredator morphology [J]. *Ecological Appl*, 2012, 22(2): 634–647.
- Coupe RH, Kalkhoff SJ, Capel PD, *et al.* Fate and transport of glyphosate and amino methylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins [J]. *Pest Manage Sci*, 2012, 68(1): 16–30.
- 张东. 误服草甘膦后洗胃致胃穿孔死亡 1 例[J]. *法医学杂志*, 2011, 27(3): 234–235.
Zhang D. A case of gastric perforation death caused by gastric lavage after glyphosate was taken by mistake [J]. *J Forensic Med*, 2011, 27(3): 234–235.
- GB 2763–2019 食品安全国家标准食品中农药最大残留限量[S].
GB 2763–2019 National food safety standard-Maximum residue limits of pesticides in Food [S].
- Royer A, Beguin S, Tabet JC, *et al.* Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in water by gas chromatography with tandem mass spectrometry after exchange ion resin purification and derivatization. Application on vegetable matrixes [J]. *Anal Chem*, 2000, 72(16): 3826–3832.
- 王凤雪, 胡明, 刘成梅, 等. 亚硝化衍生检测除草剂产品中草甘膦方法比较[J]. *农药*, 2015, 54(5): 334–336, 339.
Wang FX, Hu M, Liu CM, *et al.* Comparison of nitrosyl derivative

methods for detecting glyphosate in herbicide products [J]. *Agrochemicals*, 2015, 54(5): 334–336, 339.

- 潘丽萍, 张锋, 刘庆东, 等. 气相色谱联用质谱法同时检测人体尿液中草甘膦及氨基甲酸含量[J]. *中国工业医学杂志*, 2016, 29(1): 36–40.
Pan LP, Zhang F, Liu QD, *et al.* Detection of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in human urine by GC/MS [J]. *Chin J Ind Med*, 2016, 29(1): 36–40.
- 曹赵云, 牟仁祥, 陈铭学. 液相色谱-串联质谱法测定稻米中的草甘膦和氨基甲酸残留[J]. *色谱*, 2010, 28(8): 743–748.
Cao ZY, Mou RX, Chen MX. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in rice using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2010, 28(8): 743–748.
- 郑和辉, 李洁, 魏建荣, 等. 液相色谱串联质谱法直接进样测定水中吡喃丹、草甘膦、灭草松和 2,4-滴[J]. *卫生研究*, 2009, 38(3): 302–303.
Zheng HH, Li J, Wei JR, *et al.* Direct injection of liquid chromatography tandem mass spectrometry for determination of furandian, glyphosate, chlorpyrifos and 2,4-D in water [J]. *J Hyg Resh*, 2009, 38(3): 302–303.
- Granby K, Johannesen S, Vahl M. Analysis of glyphosate residues in cereals using liquid chromatography mass spectrometry [J]. *Food Addit Contam*, 2003, 20(8): 692–698.
- 文唤成, 孙学明, 武广元, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定土壤中草甘膦的残留量[J]. *理化检验(化学分册)*, 2017, 53(4): 479–481.
Wen HC, Sun XM, Wu GY, *et al.* Determination of glyphosate residue in soil by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Phys Test Chem Anal Part B*, 2017, 53(4): 479–481.
- Babić, Zelenika S, Macan A, *et al.* Ultrasonic extraction and TLC determination of glyphosate in the spiked red soils [J]. *Agric Conspectus Entificus*, 2005, 70(3): 99–103.
- 汪海萍, 邵燕, 王志良, 等. 分光光度法测定废水中草甘膦的探讨[J]. *环境监测管理与技术*, 2012, 24(3): 56–59.
Wang HP, Shao Y, Wang ZL, *et al.* Discussion on determination of glyphosate in wastewater by spectrophotometry [J]. *Adm Tech Environ Monit*, 2012, 24(3): 56–59.
- 黄嘉乐, 李秀英, 林森煜, 等. 离子色谱法测定茶叶中草甘膦的残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(5): 1895–1900.
Huang JL, Li XY, Lin SY, *et al.* Determination of glyphosate residues in tea by ion chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(5): 1895–1900.
- 张硕. 高效液相色谱法和离子色谱法测定转基因大豆中草甘膦含量的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2012.
Zhang S. Determination of glyphosate in genetically modified soybeans by HPLC and Ion chromatography [D]. Nanchang: Nanchang University, 2012.
- 高琳, 陈百莹, 张阿惜, 等. 亚铁氰化钾乙酸铵净化-离子色谱法检测转基因大豆的草甘膦残留[J]. *农药*, 2016, 55(2): 111–114.
Gao L, Chen BY, Zhang AX, *et al.* Determination of glyphosate residues in transgenic soybean by ion chromatography after purifying using potassium ferrocyanide-zinc acetate [J]. *Agrochemicals*, 2016, 55(2): 111–114.
- 罗彤, 付文雯, 郭卢云, 等. 离子色谱法测定不同谷物中草甘膦残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(1): 161–166.
Luo T, Fu WW, Guo LY, *et al.* Determination of glyphosate residues in different kinds of grains by ion chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(1): 161–166.
- GB/T 27404–2008 实验室质量控制规范食品理化检测[S].
GB/T 27404–2008 Laboratory quality control standard food physical and chemical testing [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



林 秀, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 358788964@qq.com